

Revendications

1. Vecteur viral caractérisé en ce qu'il comprend une unité d'expression comportant un ou plusieurs gène viraux ; ladite unité d'expression étant fonctionnelle dans
5 une cellule de complémentation et non fonctionnelle dans une cellule hôte et comprenant une ou plusieurs séquence(s) de régulation hétérologue(s).
2. Vecteur viral selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite unité d'expression comprend une ou plusieurs séquence(s) de régulation permettant
10 d'activer l'expression dudit gène viral en présence d'un inducteur et/ou d'inhiber l'expression dudit gène viral en présence d'un répresseur.
3. Vecteur viral selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite séquence de régulation peut agir au niveau de la transcription, l'élongation, le transport ou
15 la stabilité des ARN messagers ou la traduction.
4. Vecteur viral selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite séquence de régulation est placée au niveau du promoteur de ladite unité et, plus particulièrement, en amont de la TATA box.
20
5. Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite unité d'expression comprend une ou plusieurs séquence(s) de régulation sélectionnées parmi les séquences TAR, RRE, GRE, PRE, ERE, UAS Gal4, les
25 séquences de régulation du gène métallothionéine et des opérons bactériens tryptophane lactose et tétracycline.
6. Vecteur viral selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite unité d'expression comprend une ou plusieurs séquence(s) de régulation dérivant de
30 l'opéron tétracycline placée(s) en amont de la TATA box dudit promoteur, pour donner un promoteur activable par un inducteur de type trans-activateur tétracycline (tTA) et répressible par la tétracycline.

- 41 -

7. Vecteur viral selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite unité d'expression comprend une ou plusieurs séquence(s) de régulation dérivant de l'opéron tétracycline placée(s) en aval de la TATA box dudit promoteur, pour donner un promoteur répressible par le répresseur tétracycline (TetR).
- 5
8. Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 7, dérivé d'un virus sélectionné parmi le virus de l'herpès, le cytomégalovirus, l'AAV (virus associé à l'adénovirus), le poxvirus et l'adénovirus.
- 10 9. Vecteur adénoviral selon la revendication 8, dérivé d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines.
- 15 10. Vecteur viral selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il est défectif pour la replication.
11. Vecteur adénoviral selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est au moins dépourvu de tout ou partie de la région E1 et, de façon optionnelle, de tout ou
- 20 partie de la région E3.
12. Vecteur adénoviral selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs unité(s) d'expression comportant un ou plusieurs gènes viraux des régions E2, E4 ou L1-L5.
- 25
13. Vecteur adénoviral selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend une unité d'expression comportant une ou plusieurs séquence(s) de régulation dérivant de l'opéron tétracycline placée(s) en amont de la TATA box du promoteur et les cadres de lecture ouverts (ORFs) 6 et 7 de la région E4, de
- 30 manière à ce que l'expression desdits cadres de lecture soit activable par un inducteur de type trans-activateur tétracycline (tTA) et répressible par la

- 42 -

tétracycline.

14. Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique exogène placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans la cellule hôte.
15. Vecteur viral selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène est sélectionnée parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
16. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 15.
17. Cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 15 ou une particule virale infectieuse selon la revendication 16.
18. Cellule de complémentation caractérisée en ce qu'elle comprend un inducteur et/ou un répresseur.
19. Cellule de complémentation selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment d'ADN codant pour un inducteur et/ou un répresseur.
20. Cellule de complémentation selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce qu'elle dérive de la lignée 293.

21. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 20, pour la complémentation d'un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1 et au moins une seconde fonction adénovirale tardive ou précoce, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5

(i) une première cassette d'expression de tout ou partie de la région E1 d'un adénovirus placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation, et

10

(ii) une seconde cassette d'expression de tout ou partie d'une région tardive ou précoce d'un adénovirus autre que la région E1 placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation, lesdits éléments comprenant un ou plusieurs séquences de régulation selon les revendications 5 à 7.

15

22. Cellule de complémentation selon la revendication 21, caractérisée en ce que lesdits éléments de la seconde cassette d'expression comprennent un promoteur minimal muni en son extrémité 5' de 1 à 20 séquences tet O.

20

23. Cellule de complémentation selon la revendication 22, caractérisée en ce que lesdits éléments de la seconde cassette d'expression comprennent un promoteur minimal dérivé du virus CMV (Cytomégalo virus) muni en son extrémité 5' de 7 séquences tet O.

25

24. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 23 pour la complémentation d'un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1 et E4, caractérisée en ce que ladite seconde cassette d'expression est une cassette d'expression de tout ou partie de la région E4 d'un adénovirus

30

25. Cellule de complémentation selon la revendication 24, caractérisée en ce que ladite seconde cassette d'expression est une cassette d'expression des séquences

- 44 -

codant pour les cadres de lecture ouverts 6 et 7 (ORFs 6/7) de la région E4 d'un adénovirus.

26. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 23 pour la
5 complémentation d'un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1 et E2, caractérisée en ce que ladite seconde cassette d'expression est une cassette d'expression de tout ou partie de la région E2 d'un adénovirus.
27. Cellule de complémentation selon la revendication 26, caractérisée en ce que
10 ladite seconde cassette d'expression est une cassette d'expression des séquences codant pour la protéine DBP (DNA Binding Protein) de la région E2 d'un adénovirus.
28. Cellule de complémentation selon la revendication 26, caractérisée en ce que
15 ladite seconde cassette d'expression est une cassette d'expression des séquences codant pour un mutant thermosensible de la protéine DBP de la région E2 d'un adénovirus.
29. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 28 pour la
20 complémentation d'un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1 et au moins deux autres fonctions adénovirales tardives ou précoces, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une troisième cassette d'expression de tout ou partie d'une région tardive ou précoce d'un adénovirus autre que la région E1 et la région adénovirale de la seconde cassette d'expression, placée sous le contrôle
25 des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation et, de préférence d'un promoteur tel que défini à la revendication 5, 6 ou 7.
- 30 Cellule de complémentation selon la revendication 29 pour la complémentation d'un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1, E2 et E4, comprenant :
30
- (i) une première cassette d'expression de tout ou partie de la région E1

- 45 -

d'un adénovirus placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation,

5 (ii) une seconde cassette d'expression de tout ou partie de la région E4 d'un adénovirus placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation, et

10 (iii) une troisième cassette d'expression de tout ou partie de la région E2 d'un adénovirus placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans ladite cellule de complémentation,

15 lesdits éléments de la seconde et/ou de la troisième cassette d'expression comprenant un promoteur muni d'au moins une séquence tet O et, plus particulièrement un promoteur minimal dérivé du virus CMV (Cytomégalo virus) muni en son extrémité 5' de 7 séquences tet O.

20 31. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 30, caractérisée en ce que le titre en particules virales produit par ladite cellule de complémentation est supérieur à 5×10^8 pfu (unité formant des plaques)/ml.

32. Cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 31, caractérisée en ce que le titre en particules virales produit par ladite cellule de complémentation est supérieur à 1×10^{10} ifu (unité infectieuse)/ml.

25 33. Procédé de préparation d'une particule virale infectieuse selon la revendication 16, selon lequel :

30 (i) on introduit un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 15 dans une cellule de complémentation capable de compléter *in trans* ledit vecteur viral pour obtenir une cellule de complémentation transfectée ;

- 46 -

- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre l'expression des gènes viraux et la production de ladite particule virale infectieuse ; et
- 5 (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que ledit vecteur viral est un vecteur adénoviral et ladite cellule de complémentation est selon la
10 revendication 20.

35. Procédé de préparation d'une particule adénovirale infectieuse, selon lequel :

- 15 (i) on introduit un vecteur adénoviral dans une cellule de complémentation selon l'une des revendications 21 à 32, pour obtenir une cellule de complémentation infectée,
- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre l'expression des gènes viraux et la production de ladite particule virale infectieuse ; et
20
- (iii) on récupère ladite particule virale infectieuse dans la culture cellulaire.

25 36. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 15, une particule virale infectieuse selon la revendication 16 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon l'une des revendications 33 à 35, une cellule hôte eucaryote selon la revendication 17, une cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 32, en association
30 avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique

- 47 -

37. Usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 15, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 16 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé de préparation selon l'une des revendications 33 à 35, d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 17 ou
- 5 d'une cellule de complémentation selon l'une des revendications 18 à 32, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

38. Usage selon la revendication 37 en association avec un répresseur.